

UNIVERSITE D'ANGERS

FACULTE DE MEDECINE

Année 2013

N°

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en : ANESTHESIE-REANIMATION

Par

Hélène RICHARD MOUBARAK

Née le 2 mars 1982 à Alençon (Orne)

Présentée et soutenue publiquement le : 15 mai 2013

***ETUDE IN VITRO DE LA STABILITE DU ZICONOTIDE A FAIBLE
CONCENTRATION DANS LES POMPES INTRATHECALES.***

Président : Monsieur le Professeur Laurent BEYDON

Directeur : Monsieur le Docteur Denis DUPOIRON

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE D'ANGERS

Doyen
Vice doyen recherche
Vice doyen pédagogie

Pr. RICHARD
Pr. BAUFRETON
Pr. COUTANT

Doyens Honoraires : Pr. BIGORGNE, Pr. EMILE, Pr. REBEL, Pr. RENIER, Pr. SAINT-ANDRÉ

Professeur Émérite : Pr. Gilles GUY, Pr. Jean-Pierre ARNAUD

Professeurs Honoraires : Pr. ACHARD, Pr. ALLAIN, Pr. ALQUIER, Pr. BASLÉ, Pr. BIGORGNE, Pr. BOASSON, Pr. BOYER, Pr. BREGEON, Pr. CARBONNELLE, Pr. CARON-POITREAU, Pr. M. CAVELLAT, Pr. COUPRIS, Pr. DAUVER, Pr. DELHUMEAU, Pr. DENIS, Pr. DUBIN, Pr. EMILE, Pr. FOURNIÉ, Pr. FRANÇOIS, Pr. FRESSINAUD, Pr. GESLIN, Pr. GROSIEUX, Pr. GUY, Pr. HUREZ, Pr. JALLET, Pr. LARGET-PIET, Pr. LARRA, Pr. LIMAL, Pr. MARCAIS, Pr. PARÉ, Pr. PENNEAU, Pr. PIDHORZ, Pr. POUPLARD, Pr. RACINEUX, Pr. REBEL, Pr. RENIER, Pr. RONCERAY, Pr. SIMARD, Pr. SORET, Pr. TADEI, Pr. TRUELLE, Pr. TUCHAIS, Pr. WARTEL

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

MM. ABRAHAM Pierre	Physiologie
ASFAR Pierre	Réanimation médicale
AUBÉ Christophe	Radiologie et imagerie médicale
AUDRAN Maurice	Rhumatologie
AZZOUZI Abdel-Rahmène	Urologie
Mmes BARON Céline	Médecine générale (professeur associé)
BARTHELAIX Annick	Biologie cellulaire
MM. BATAILLE François-Régis	Hématologie ; Transfusion
BAUFRETON Christophe	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BEAUCHET Olivier	Médecine interne, gériatrie et biologie du vieillissement
BEYDON Laurent	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
BIZOT Pascal	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BONNEAU Dominique	Génétique
BOUCHARA Jean-Philippe	Parasitologie et mycologie
CALÈS Paul	Gastroentérologie ; hépatologie
CAMPONE Mario	Cancérologie ; radiothérapie option cancérologie
CAROLI-BOSC François-Xavier	Gastroentérologie ; hépatologie
CHABASSE Dominique	Parasitologie et mycologie
CHAPPARD Daniel	Cytologie et histologie
COUTANT Régis	Pédiatrie
COUTURIER Olivier	Biophysique et Médecine nucléaire
DARSONVAL Vincent	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
de BRUX Jean-Louis	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
DESCAMPS Philippe	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
DIQUET Bertrand	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique

	DUVERGER Philippe	Pédopsychiatrie
	ENON Bernard	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
	FANELLO Serge	Épidémiologie, économie de la santé et prévention
	FOURNIER Henri-Dominique	Anatomie
	FURBER Alain	Cardiologie
	GAGNADOUX Frédéric	Pneumologie
	GARNIER François	Médecine générale (professeur associé)
MM.	GARRÉ Jean-Bernard	Psychiatrie d'adultes
	GINIÈS Jean-Louis	Pédiatrie
	GRANRY Jean-Claude	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
	HAMY Antoine	Chirurgie générale
	HUEZ Jean-François	Médecine générale
Mme	HUNAUULT-BERGER Mathilde	Hématologie ; transfusion
M.	IFRAH Norbert	Hématologie ; transfusion
Mmes	JEANNIN Pascale	Immunologie
	JOLY-GUILLOU Marie-Laure	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MM.	LACCOURREYE Laurent	Oto-rhino-laryngologie
	LASOCKI Sigismond	Anesthésiologie et réanimation ; médecine d'urgence option anesthésiologie et réanimation
	LAUMONIER Frédéric	Chirurgie infantile
	LE JEUNE Jean-Jacques	Biophysique et médecine nucléaire
	LE ROLLE Nicolas	Réanimation médicale
	LEFTHÉRIOTIS Georges	Physiologie
	LEGRAND Erick	Rhumatologie
Mme	LUNEL-FABIANI Françoise	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MM.	MALTHIÉRY Yves	Biochimie et biologie moléculaire
	MARTIN Ludovic	Dermato-vénéréologie
	MENEI Philippe	Neurochirurgie
	MERCAT Alain	Réanimation médicale
	MERCIER Philippe	Anatomie
Mmes	NGUYEN Sylvie	Pédiatrie
	PENNEAU-FONTBONNE Dominique	Médecine et santé au travail
MM.	PICHARD Eric	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
	PICQUET Jean	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
	PODEVIN Guillaume	Chirurgie infantile
	PROCACCIO Vincent	Génétique
	PRUNIER Fabrice	Cardiologie
	REYNIER Pascal	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	RICHARD Isabelle	Médecine physique et de réadaptation
MM.	RODIEN Patrice	Endocrinologie et maladies métaboliques
	ROHMER Vincent	Endocrinologie et maladies métaboliques

ROQUELAURE Yves	Médecine et santé au travail
Mmes ROUGÉ-MAILLART Clotilde	Médecine légale et droit de la santé
ROUSSELET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MM. ROY Pierre-Marie	Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie
SAINT-ANDRÉ Jean-Paul	Anatomie et cytologie pathologiques
SENTILHES Loïc	Gynécologie-obstétrique
SUBRA Jean-François	Néphrologie
URBAN Thierry	Pneumologie
VERNY Christophe	Neurologie
VERRET Jean-Luc	Dermato-vénéréologie
MM. WILLOTEAUX Serge	Radiologie et imagerie médicale
ZANDECKI Marc	Hématologie ; transfusion

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

MM. ANNAIX Claude	Biophysique et médecine nucléaire
ANNWEILER Cédric	Médecine interne, gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie option , gériatrie et biologie du vieillissement
Mmes BEAUVILLAIN Céline	Immunologie
BELIZNA Cristina	Médecine interne, gériatrie et biologie du vieillissement
BLANCHET Odile	Hématologie ; transfusion
M. BOURSIER Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
Mme BOUTON Céline	Médecine générale (maître de conférences associé)
MM. CAILLIEZ Éric	Médecine générale (maître de conférences associé)
CAPITAIN Olivier	Cancérologie ; radiothérapie
CHEVAILLER Alain	Immunologie
Mme CHEVALIER Sylvie	Biologie cellulaire
MM. CONNAN Laurent	Médecine générale (maître de conférences associé)
CRONIER Patrick	Anatomie
CUSTAUD Marc-Antoine	Physiologie
Mme DUCANCELLE Alexandra	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MM. DUCLUZEAU Pierre-Henri	Nutrition
FORTRAT Jacques-Olivier	Physiologie
HINDRE François	Biophysique et médecine nucléaire
JEANGUILLAUME Christian	Biophysique et médecine nucléaire
Mme JOUSSET-THULLIER Nathalie	Médecine légale et droit de la santé
MM. LACOEUILLE Franck	Biophysique et médecine nucléaire
LETOURNEL Franck	Biologie cellulaire

Mmes LOISEAU-MAINGOT Dominique	Biochimie et biologie moléculaire
MARCHAND-LIBOUBAN Hélène	Biologie cellulaire
MAY-PANLOUP Pascale	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
MESLIER Nicole	Physiologie
MM. MOUILLIE Jean-Marc	<i>Philosophie</i>
PAPON Xavier	Anatomie
Mmes PASCO-PAPON Anne	Radiologie et Imagerie médicale
PELLIER Isabelle	Pédiatrie
PENCHAUD Anne-Laurence	<i>Sociologie</i>
M. PIHET Marc	Parasitologie et mycologie
Mme PRUNIER Delphine	Biochimie et biologie moléculaire
M. PUISSANT Hugues	Génétique
Mmes ROUSSEAU Audrey	Anatomie et cytologie pathologiques
SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
MM. SIMARD Gilles	Biochimie et biologie moléculaire
TURCANT Alain	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique

septembre 2012

COMPOSITION DU JURY

Président du jury :

Monsieur le Professeur BEYDON Laurent

Directeur de thèse :

Monsieur le Docteur DUPOIRON Denis

Membres du jury :

Docteur DUPOIRON Denis

Professeur DIQUET Bertrand

Professeur VERNY Christophe

Docteur BOISDRON-CELLE Michelle

A MON PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Laurent BEYDON
Professeur d'Anesthésie-Réanimation chirurgicale à la faculté
de Médecine de l'Université d'Angers.

Que ce travail soit l'occasion de vous remercier pour votre
enseignement.

Au cours de mon internat, j'ai pu apprécier votre savoir et la
valeur de votre expérience clinique.

Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde
reconnaissance et mon respect.

Vous me faites l'honneur de présider ce jury.

A MON DIRECTEUR DE THESE,

Monsieur le Docteur Denis DUPOIRON
Anesthésiste-Réanimateur et Chef de service du département
d'anesthésie-douleur de l'ICO Centre Paul PAPIN

Tu es à l'origine de ce travail.

Je te remercie pour ta disponibilité, ta patience et tout le plaisir
que j'ai eu lors de la réalisation de cette étude.

Je te remercie pour la confiance que tu m'as témoignée.

Tu m'as transmis avec rigueur et motivation tes connaissances.

Trouves ici l'expression de ma très grande reconnaissance et
de mon respect.

A Monsieur le Professeur Bertrand DIQUET

Professeur de pharmacologie fondamentale et clinique à la faculté de médecine de l'Université d'Angers.

Chef de service du laboratoire de pharmacologie et toxicologie du CHU d'Angers.

Vous avez eu la gentillesse de bien vouloir faire partie de mon jury.

Vous me faites l'honneur de vous intéresser à notre travail.

Veillez trouver ici le témoignage de ma considération et de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Christophe VERNY

Professeur en Neurologie à la faculté de Médecine de l'Université d'Angers.

Chef du service de neurologie du CHU d'Angers.

Vous avez eu la gentillesse de bien vouloir faire partie de mon jury.

Vous me faites l'honneur de vous intéresser à notre travail.

Veillez trouver ici le témoignage de ma considération et de ma reconnaissance.

A Madame le Docteur Michelle BOISDRON-CELLE

Docteur en pharmacie ICO d'Angers Centre Paul Papin.

Merci pour l'aide précieuse que vous m'avez apportée pour la réalisation de ce travail.

Vous me faites l'honneur de participer à mon jury.

Trouvez ici l'expression de mon respect et le témoignage de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jean Claude Granry,

Professeur d'Anesthésie-Réanimation chirurgicale à la faculté de Médecine de l'Université d'Angers.

Merci de m'avoir accueilli au sein de votre département.

Et de m'avoir permis de bénéficier de l'enseignement au sein de celui-ci.

Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Sigismond LASOCKI

Professeur d'Anesthésie-Réanimation chirurgicale à la faculté de Médecine de l'Université d'Angers.

Merci pour votre enseignement et surtout votre aide à la réalisation de mon mémoire.

Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

Merci à Vincent et Marie Claire sans qui ce travail n'aurait pu aboutir... Votre investissement et votre rigueur ont été précieux....

Merci à l'ensemble de l'équipe d'anesthésie réanimation de l'ICO Centre Paul Papin, la qualité de votre travail, votre accueil toujours si chaleureux m'ont donné encore plus envie d'exercer notre métier.

Aux anesthésiste réanimateurs praticiens hospitaliers du CHU d'Angers et du CH du Mans, merci de m'avoir transmis votre savoir, votre expérience et merci pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ces cinq années. Avec une spéciale dédicace pour Stan, Guillaume, Damien et Soizic pour ces 6 derniers mois ...

Aux IADES du CHU d'Angers, merci d'avoir contribué à ma formation et merci pour la complicité et la complémentarité de chaque jour.....

A mes parents, à qui ce travail est dédié... sans vous rien n'aurait été possible. Vous avez toujours su être présents, m'accompagner tout en me laissant faire mes propres choix. Merci pour votre Amour, votre soutien, votre présence... qui sont une de mes grandes richesses...

A Elie, pour tout l'Amour que tu m'apportes chaque jour. Tu es l'homme de ma vie, tu sais être présent quoiqu'il arrive et me soutenir dans tous mes projets. Merci pour la force que tu m'apportes. Tu es mon rayon de soleil....

A mon petit Jean, mon petit Cœur....Merci pour tout l'Amour que tu m'offres.

A mon « Petit Grand » Frère, Olivier, merci d'avoir toujours été mon semblable, ton soutien et ton amour me sont très précieux. Je suis très fière du chemin que tu as choisi...Ta grande sœur...

A mes grands mères, Simone et Angèle, merci d'avoir toujours été des models de volonté, détermination et d'affection..... parce que vous m'avez montré la voie...

A mes grands pères, Henri pour ton sens du travail et ta curiosité, *René* pou ta légèreté et les fous rires...

A Emilie, Julien, Sébastien et Raphaël, mes cousins, pour tous les moments de complicité qui ont rendu si belle mon enfance, en espérant partager encore d'autres beaux moments...

A Jean René, Jeanine, Bernadette et Jean Pierre, mes oncles et tantes, et à l'ensemble de ma famille, merci pour l'affection que vous m'avez toujours témoigné.

A Sophie, merci pour ton soutien et ton aide au cours de ces dernières années et surtout pour la belle famille que vous formez...et à mes petits neveux Martin et Louis.

A Toufika, Jean, Philippe, Myrna, Carla et mes « grands petits neveux et nièces » merci de m'avoir accueillie si chaleureusement dans votre famille...

A Véro, mon amie de toujours... Que de moments partagés, ta présence, ton soutien et notre complicité me sont essentiels. Merci... Spéciale dédicace à ta maman.

A Anne et Vincent, Camille et Julien, Dorothée, Mireille, Virginie et Frédéric, mes complices de toutes ces années d'externat... Merci pour tous les instants partagés et votre présence d'hier, d'aujourd'hui et de demain...

A mes acolytes d'anesthésie-réanimation, Aurélie pour nos conversations de filles... et nos péripéties ménagères...
Manu, pour la carte d'étudiant, et nos « toi aussi ça t'es arrivé » si rassurants ...

A Alexis, Clément.. et l'ensemble des internes d'anesthésie réanimation. Merci...

Liste des Abréviations

IT : Intrathécale

U. H. P. L. C. : Ultra High Pressure Liquid Chromatography

Table des matières

I. Introduction	16
II. Matériel et méthodes.....	19
A. Drogues	19
1. Le ziconotide	19
2. Le sulfate de morphine (50 mg/ml).....	19
3. La clonidine (150 mcg/ml)	19
4 La ropivacaïne (10 mg/ml)	19
B. Matériel.....	20
1. U.H.P.L.C	20
2. Pompes Synchromed II® Medtronic	20
C. Préparation des solutions contenant les ziconotide	20
D. Méthode de remplissage.....	21
E. Conservation.....	21
F. Dosage.....	21
1. Contrôle.....	21
2. Méthode de prélèvement	22
a) Quantification de la morphine et de la ropivacaïne.	22
b) Quantification de la clonidine et du ziconotide.....	22
c) Quantification de la concentration commerciale du ziconotide dans sa présentation d'origine (100mcg/ml).	22
3. Méthode de quantification.....	23
a) Morphine - ropivacaïne.	23
b) Clonidine - ziconotide.....	23
4. Concentrations étudiées.....	24
G. Les tests statistiques	24
III Résultats	25
A. Stabilité de l'association ziconotide, morphine, ropivacaïne et clonidine in vitro.....	25
B. Stabilité ziconotide seul.....	25
C. Stabilité ziconotide à 5°C dans les seringues	28
D. Conformité des préparations de ziconotide	29

IV. Discussion	30
A. Interprétation des résultats.....	30
1. Stabilité du ziconotide en association	30
2. Stabilité du ziconotide seul	32
3. Comparaison des cinétiques du ziconotide seul à 0,25 et 0.5 µg/ml et en association dans les pompes à 37°C.	33
4 Stabilité à 5°C	34
B. Intérêt clinique.....	35
1. Fréquence des remplissages	35
2. La conformité des préparations	35
3. Conservation des préparations.	35
C. Limites de l'étude	36
1. Données partielles	36
2. Absence de contrôle des seringues à 37°C	36
3. Analyse du pH.....	36
V. Conclusion.....	37
Bibliographie	38
Liste des figures	39

I. Introduction

L'analgésie intrathécale a connu au cours des 20 dernières années un développement considérable, en raison de son efficacité clinique prouvée, notamment dans les pathologies cancéreuses [1], et par la mise à disposition de pompes implantables au décours des années 90.

Les traitements antalgiques par cette voie, reposaient initialement sur l'infusion d'opioïdes et particulièrement de la morphine qui depuis toujours est considérée comme le médicament de référence à utiliser en première intention même dans les conférences de consensus les plus récentes [2-6]. Progressivement, l'utilisation d'autres antalgiques par voie intrathécale, seuls ou en association avec un morphinique s'est développée. Ainsi, la commercialisation aux USA en 2004 d'un nouvel antalgique, le ziconotide, a considérablement modifié la prise en charge des douleurs par voie intrathécale.

Le ziconotide, est la version synthétique du ω -conotoxine MVIIA, conopeptide neuroactif extrait du venin d'un escargot marin « conus magus ». La molécule, très hydrophile, est un petit peptide de 25 acides aminés et d'un poids moléculaire d'environ 2500 daltons [7]. C'est un analgésique non opioïde. Il appartient à une nouvelle classe de puissants analgésiques, les inhibiteurs des canaux calciques voltage dépendants de type N (N type Calcium Channel Blockers) [8]. Il bloque sélectivement ces canaux calciques des fibres A δ et C localisés en pré synaptique au niveau médullaire et diminue ainsi la libération du glutamate [9]. Son action antalgique a été mise en évidence chez l'animal [10, 11] puis chez l'homme [8, 12, 13]. Il est validé depuis 2004 par la Food and Drug Administration [14] et par l'E.M.E.A. (European Medicines Agency) depuis 2005 [15] dans l'analgésie intrathécale pour les douleurs chroniques, en cas d'échec ou d'intolérance aux autres traitements tels l'analgésie systémique ou la morphine intrathécale (IT).

Plusieurs publications ont mis en évidence l'action synergique des associations d'antalgiques en intrathécal et notamment celles contenant du ziconotide [16, 17]. De plus, l'utilisation de ces associations a fait l'objet de plusieurs conférences de consensus notamment aux Etats Unis afin de définir les protocoles d'incrémentation des antalgiques par cette voie d'administration [2, 5, 18, 19]

Cette technique d'analgésie s'est développée plus récemment en France, particulièrement dans les pathologies cancéreuses [20]. L'anesthésique local de référence pour cette voie d'administration, la bupivacaïne, recommandée par les conférences de consensus [2, 4], n'est pas disponible dans le pays à des concentrations suffisantes pour ce mode de traitement et c'est la ropivacaïne qui est le plus souvent utilisée comme anesthésique local en association avec la morphine, le ziconotide et parfois la clonidine. [21]

Cependant, l'utilisation de ces associations d'antalgiques intrathécaux est complexe à mettre en œuvre et nécessite de connaître la stabilité des mélanges, dans les pompes entre deux remplissages, ainsi que leur compatibilité avec le matériel utilisé. En effet, si le ziconotide semble stable dans les pompes implantables lorsqu'il est utilisé seul à des concentrations élevées (100µg/ml)[22], il n'en est pas de même lorsque la concentration diminue et lorsqu'il est utilisé en association avec d'autres antalgiques, comme la morphine [23], l'association morphine-clonidine[24] et la bupivacaïne [25]. Les seules études publiées à ce jour, l'ont été pour des associations de seulement deux ou trois drogues, « ziconotide et bupivacaïne [25] », « ziconotide , clonidine et (ou) morphine » [24], « ziconotide et morphine » [23] et toujours avec des concentrations de ziconotide élevées (25µg/ml).

Dans ce contexte, aucune étude n'a évalué, à ce jour, la stabilité de ce type d'associations médicamenteuses contenant à la fois de la morphine, de la ropivacaïne, de la clonidine et du ziconotide, dans les pompes intrathécales. Parallèlement, plusieurs publications ont mis en évidence la nécessité de débiter les traitements par ziconotide à des posologies faibles avec des incrémentations lentes afin de limiter le taux d'effets indésirables graves, notamment neuro-psychiques. [8, 17, 21, 26].

De plus, la concentration initiale de la préparation commerciale du ziconotide est en France, uniquement de 100µg/ml, ce qui rend la composition des solutions à faible concentration, particulièrement délicate. Ces contraintes rendent nécessaire, l'utilisation de faibles quantités et de dilutions importantes de ziconotide dans les préparations. Or les concentrations utilisées lors des précédentes et seules études de stabilité (25 à 100µg/ml) [8, 17, 21, 26] étaient largement plus élevées que celles utilisées en clinique pour les patients cancéreux [21]. Ces mêmes études ont montré une dégradation progressive du ziconotide en association notamment avec la morphine [23].

Il est donc essentiel de connaître la stabilité de ce type de mélange ainsi que la conformité des préparations par rapport aux prescriptions initiales compte tenu de ces contraintes. C'est l'objectif de ce travail.

Au cours de cette étude préliminaire, nous avons donc cherché à évaluer:

- La stabilité du ziconotide à des concentrations différentes en association avec un mélange de sulfate de morphine, de ropivacaïne et de clonidine correspondant aux concentrations moyennes utilisées en pratique clinique [20].

- La stabilité du ziconotide seul à des concentrations faibles correspondant également à notre utilisation clinique dans des pompes intrathécales afin d'évaluer l'influence des autres traitements sur la stabilité du ziconotide.

- La stabilité du ziconotide à concentrations faibles seul et en association dans des seringues maintenues à 5°C, afin de connaître le délai autorisable entre la préparation des mélanges et leur administration dans ces conditions de stockage.

En parallèle nous avons étudié :

- La stabilité de la morphine, de la ropivacaïne et de la clonidine dans les mélanges aux concentrations étudiées.

- La conformité des préparations effectuées.

II. Matériel et méthodes

Les dosages du ziconotide, du sulfate de morphine, de la ropivacaïne et de la clonidine ont été réalisés par chromatographie ultra haute performance en phase liquide : U. H. P. L. C. (Ultra High Pressure Liquid Chromatography).

A. Drogues

Les médicaments utilisés au cours de l'étude ont été :

1. Le ziconotide.

Le ziconotide était extrait à partir d'un flacon de 1 ml à une concentration de 100 µg/ml.

2. Le sulfate de morphine (50 mg/ml).

C'est un morphinomimétique, sans adjuvant, dont l'hydrophilie assure un effet prolongé [27] par voie intrathécale. La concentration finale en sulfate de morphine dans les préparations ne doit jamais excéder 20mg/ml comme recommandée par les conférences de consensus de 2007 et 2012 afin de prévenir le risque de syndrome de masse spinale [28].

3. La clonidine (150mcg/mL).

Elle inhibe les impulsions nociceptives en activant les adrénorécepteurs pré et post synaptiques α_2 dans la corne dorsale de la moelle épinière et possiblement en inhibant la libération de substance P [29, 30].

4. La Ropivacaïne (10 mg/ml).

Les anesthésiques locaux, inhibiteurs des canaux sodiques, sont souvent des médicaments de seconde ligne dans le cadre de l'analgésie intrathécale mais peuvent être utilisés en première ligne en association avec la morphine dans les douleurs cancéreuses [31]. La bupivacaïne est généralement choisie du fait de sa longue durée d'action, mais en France cette molécule n'est pas disponible aux hautes concentrations requises pour une administration intrathécale. Nous utilisons donc la ropivacaïne.

B. Matériel

1. U.H.P.L.C.

Pour la réalisation des dosages, nous avons utilisé l'UHPLC Perkin Elmer : flexar FX-10 avec son détecteur UV-Visible avec une colonne Kinetex 2.6µm C18 100A 150x2.1mm (Phenomenex) chauffée à 50°C avec un débit de 0.5ml/min (pression du system 5500psi). Les gradients d'élution sont réalisés avec la phase mobile A : eau à 0.1% acide trifluoroacétique et la phase mobile B : acétonitrile à 0.1% acide trifluoroacétique.

Les préparations des échantillons étaient réalisées avec des pipettes calibrées (40µL, 200µL, 1000µL et 10000µL), des tubes de 2mL en polypropylènes et des flacons de 50mL.

2. Pompes Synchronomed II® Medtronic

Quatre pompes de type Synchronomed II® Medtronic de 20 ml, naïves, ont été utilisées pour la réalisation de cette étude. Les 4 pompes n'ont pas été rincées au préalable avec une solution de ziconotide. L'étude de stabilité du ziconotide seul au sein des pompes intrathécales a été réalisée dans un deuxième temps et nous avons utilisé les mêmes pompes que lors de l'étude de stabilité du ziconotide en mélange. Ces pompes ont été rincées au sérum salé isotonique avant d'être remplies à nouveau avec les préparations de ziconotide seul aux dilutions de 0,25; 0,5; 0,75 et 1µg/ml dans des seringues de 20 ml.

C. Préparation des solutions contenant le ziconotide

Les préparations des solutions pour cette étude ont été réalisées dans des conditions identiques à celles de notre pratique clinique quotidienne, de l'analgésie intrathécale. Ces préparations ont été effectuées sous hotte à flux laminaire, dans des conditions d'asepsie strictes, par la pharmacie à usage intérieur (P.U.I.) de l'ICO (Institut de Cancérologie de l'Ouest), Angers.

Les doses à prélever pour obtenir les concentrations voulues étaient calculées à l'aide d'un logiciel développé localement pour les prescriptions intrathécales (Access 97 Microsoft corporation)

Le ziconotide était prélevé à l'aide d'une seringue de 1 ml pour obtenir des concentrations de 0,1; 0,25; 0,5 et 0,75 µg/ml respectivement dans chacune des quatre seringues de 20 ml.

Le sulfate de morphine, la ropivacaïne et la clonidine, sous forme non lyophilisés, étaient prélevés directement vers la seringue de 20 ml avec une aiguille de 20 G pour obtenir des concentrations fixes de 7,5 mg/ml pour le sulfate de morphine et la ropivacaïne et de 15 µg/ml pour la clonidine.

La seringue était ensuite remplie de sérum salé isotonique en complément pour obtenir une solution de 20 ml. Pour les préparations de ziconotide seul, nous avons utilisé la même méthode de préparation, des seringues de 20 ml avec une dilution du ziconotide par du sérum salé isotonique.

D. Méthode de remplissage

Les pompes natives étaient préalablement vidées de leur 17,5 ml d'eau stérile. Une première vidange de la pompe était réalisée à l'aide d'une aiguille de Huber courbe 22G et une seringue de 50 ml.

Au moyen d'une aiguille de Huber, les quatre pompes étaient ensuite remplies de mélanges similaires en ropivacaïne 7,5 mg/ml, morphine 7,5 mg/ml, clonidine 15 µg/ml et avec des concentrations variables de ziconotide 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 µg/ml pour chaque pompe.

E. Conservation

Les 4 pompes ont ensuite été disposées dans une étuve à 37°C pendant 40 jours. On a disposé dans le même temps, dans l'étuve, un flacon de ziconotide à 100 µg/ml (dans son emballage d'origine).

Des seringues témoins de chaque dosage étaient conservées à 5°C simultanément pour contrôler l'évolution des concentrations pendant l'étude cinétique.

F. Dosage

1. Contrôle.

Lors de la réception des préparations pharmaceutiques (seringues de 20 ml) injectées dans les pompes, 250 µL étaient prélevés afin de réaliser une première quantification par UHPLC. Ces premiers dosages seront ensuite considérés comme les concentrations témoins.

2. Méthode de prélèvement.

Avant chaque ponction dans les pompes, celles-ci étaient légèrement agitées avant le prélèvement de 250µL de mélange pour effectuer les dosages par UHPLC. On a effectué ainsi, trois prélèvements de 250µL par pompe et par temps.

Les prélèvements étaient réalisés au premier jour (J1) puis J2, J4, J7, J10, J14, J17, J21, J24, J28, J31, J35, J38, J42. Au total, 42 prélèvements ont été exécutés pour effectuer la totalité de la cinétique pour une pompe (trois séquences de dosages étant réalisées à chaque cinétique).

a) Quantification de la morphine et de la ropivacaïne.

Les solutions analgésiques à doser étaient diluées avant injection pour obtenir des concentrations en morphine et ropivacaïne compatibles avec les gammes de concentrations. 100µL du prélèvement étaient nécessaires. Ils étaient ensuite dilués au 50^e soit une première dilution de 100µL de prélèvement avec 900µL de sérum salé isotonique, puis une deuxième dilution 100µL du prélèvement dilué avec 400µL de sérum salé isotonique.

b) Quantification de la clonidine et du ziconotide.

100µL de prélèvement étaient nécessaires : ils étaient introduits sans dilution dans un vial de l'UHPLC.

c) Quantification de la concentration commerciale du ziconotide dans sa présentation d'origine (100µg/ml).

10ml de sérum salé isotonique était diluée avec 30µL de ziconotide, soit une concentration de ziconotide de 0.3µg/ml. Les différents prélèvements étaient ensuite introduits dans un vial de l'UHPLC.

3. Méthode de quantification.

Nous avons utilisé 2 méthodes de quantification :

a) Morphine - ropivacaïne.

Le volume d'injection est de 5µl et la détection s'effectue à la longueur d'onde de 210 nm. Le gradient d'élution commence avec une composition 95% de la phase mobile A et 5% de phase mobile B, en 3 min à 50% de phase mobile A et 50% de phase mobile B. On maintient pendant 2 min puis on revient dans les conditions d'équilibre de la colonne 95% de la phase mobile A et 5% de phase mobile B en 1 min et on maintient 6 min. Les points de calibration de la morphine et de la ropivacaïne sont réalisés simultanément à des concentrations de 12.5µg/ml, de 25µg/ml, de 50µg/ml, de 100 µg/ml, 140µg/ml et de 200µg/ml, les dilutions sont réalisées successivement ou « en cascade » (la solution la plus concentrée est diluée pour obtenir la solution suivante et ainsi de suite). Dans nos conditions d'élution et de concentration, les temps de rétention sont de 2.6 min pour la morphine et de 6.6 min pour la ropivacaïne.

b) Clonidine – ziconotide.

Une 2^{ème} méthode permet de doser la clonidine et le ziconotide. Le volume d'injection est de 10µl et la détection s'effectue à la longueur d'onde de 205 nm. On commence avec une composition de 95% de la phase mobile A et 5% de phase mobile B maintenue pendant 3 min puis un gradient d'élution en 6 min à 70% de phase mobile A et 30% de phase mobile B puis 50% de phase mobile A et 50% de phase mobile B en 2 min, on revient dans les conditions d'équilibre de la colonne 95% de la phase mobile A et 5% de phase mobile B en 2 min et on maintient 10 min.

Les gammes d'étalonnage de la clonidine et du ziconotide sont réalisées séparément. Les points de calibration de la clonidine sont réalisés à des concentrations de 0.625µg/ml, 1.25µg/ml, 2.5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml et 20µg/ml (dilutions « en cascade »). Les points de calibration du ziconotide sont réalisés en une seule dilution indépendamment les uns des autres avec des flacons en polypropylène (avec des dilutions successives et/ou des flacons en verre la courbe de quantification n'est pas linéaire): 0.1µg/ml (20µl de ziconotide à 100µg/ml + 20mL Chlorure de sodium 0.9%), 0.3µg/ml (30µl de ziconotide à 100µg/ml + 10mL Chlorure de sodium 0.9%), 0.6µg/ml (60µl de ziconotide à 100µg/ml + 10mL Chlorure de sodium 0.9%), 0.79µg/ml (80µl de ziconotide à 100µg/ml + 10mL Chlorure de sodium 0.9%), 1.57µg/ml (160µl de ziconotide à 100µg/ml + 10mL Chlorure de sodium 0.9%), 1.96µg/ml (200µl de ziconotide à 100µg/ml + 10mL Chlorure de sodium 0.9%). Nous ajoutons les 2 courbes de quantifications dans une même

méthode de « process » pour pouvoir quantifier la clonidine et le ziconotide en même temps (sur un même chromatogramme).

Dans nos conditions d'élution et de concentration, les temps de rétention sont de 6.3 min pour la clonidine et de 11.5 min pour le ziconotide (la clonidine doit être éluée sur le palier de départ composé de 95% de la phase mobile A et 5% de phase mobile B pour être séparée d'un pic parasite) [24].

4. Concentrations étudiées.

Nous avons étudié la stabilité du ziconotide à 4 dosages différents 0.1; 0,25; 0,5; 0,75 µg/ ml avec des mélanges similaires de ropivacaïne 7,5 mg/ml, morphine 7,5 mg/ml et clonidine 15 µg/ml, conservées dans des pompes naïves à 37°C. Puis nous avons analysé la stabilité du ziconotide seul à quatre dosages différents (0,25; 0,5; 0,75 et 1 µg/ml) dans des pompes à 37°C. Les mêmes dosages ont également été réalisés pour étudier la stabilité du ziconotide à 4 dosages différents en mélange conservés dans des seringues à 5°C pendant une durée de 40 jours.

G. Les tests statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel winSTAT 7.0TM (Fitch Software). Les données sont présentées en valeurs moyennes +/- écart type.

III. Résultats

A. Stabilité de l'association ziconotide, morphine, ropivacaïne et clonidine in vitro

L'analyse des échantillons prélevés sur les pompes natives in vitro à 37°C met en évidence une décroissance quasi linéaire des concentrations de ziconotide en association. Il reste en moyenne de 82,72%(+/- 0,89%) à 7 jours, 72,85 %(+/-1,14%) à 17 jours et 53,4% (+/-3,33%) à 35 jours de la concentration initiale de ziconotide. (Figure 1)

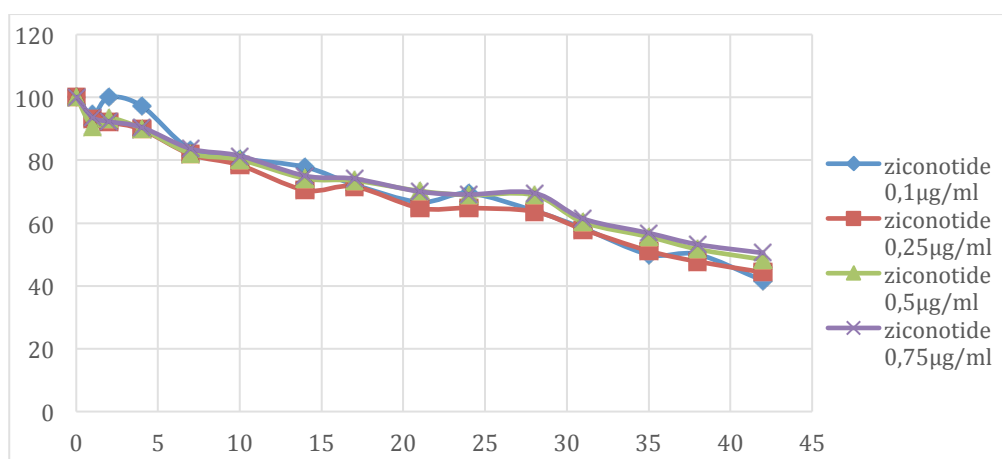


Figure 1. Stabilité du ziconotide (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 µg/ml) en mélange avec des dosages fixes de morphine (7,5mg/ml), clonidine (15mcg/ml), ropivacaïne (7,5 mg/ml) in vitro, pompes natives à 37°C. Concentration de ziconotide exprimée en pourcentage de la concentration initiale de ziconotide à J0.

Cette décroissance est modérément influencée par la concentration de ziconotide dans le mélange, la dose résiduelle à 42 jours étant respectivement de 41,67% pour la concentration à 0,1µg/ml, de 44,32% pour la concentration à 0,25µg/ml, de 48,34 % pour la concentration à 0,50µg/ml, de 50,45% pour la concentration à 0,75µg/ml. La différence n'est pas significative.

Les concentrations de ropivacaïne, morphine et clonidine, elles sont parfaitement stables dans les pompes quelque soit les concentrations de ziconotide. Pour la morphine, on retrouve une concentration moyenne sur les 4 pompes à 101% (+/- 0,44%) de la concentration initiale à J42. (Figure2)

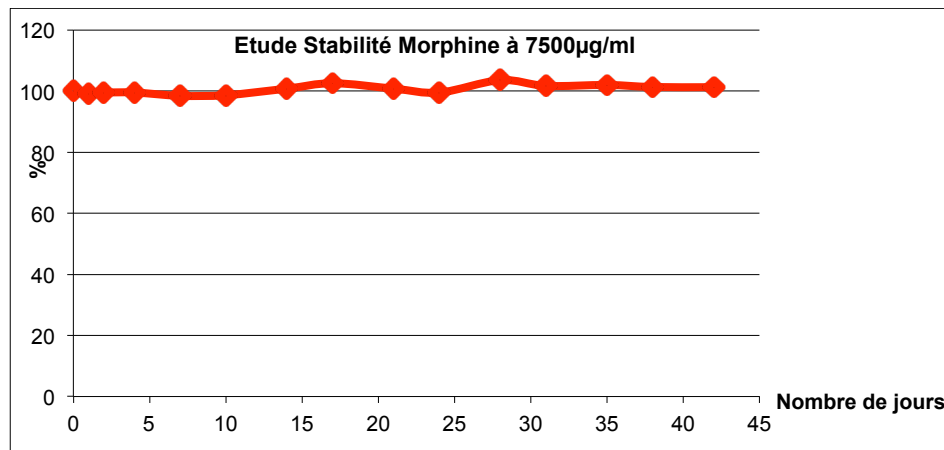


Figure 2. Stabilité de la morphine 7500 µg/ml en mélange avec ziconotide, ropivacaïne et clonidine dans des pompes intrathécales naïves à 37°C in vitro. Concentration de morphine exprimée en pourcentage de la concentration initiale en morphine à J0.

Les concentrations de ropivacaïne à J42 sont également stables par rapport à la concentration initiale sur les 4 pompes avec une concentration à 42 jours à 102,3% (+/- 0,50%) de la concentration initiale. (Figure 3)

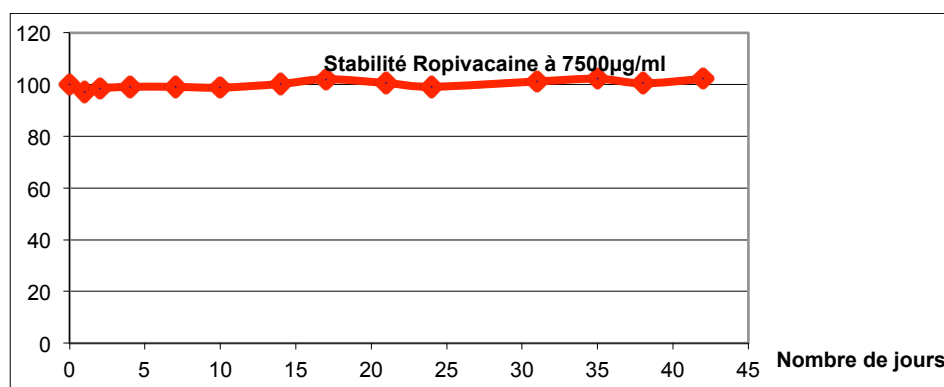


Figure 3. Stabilité de la ropivacaïne 7500 µg/ml en mélange avec ziconotide, morphine et clonidine dans des pompes intrathécales naïves à 37°C in vitro. Concentration de morphine exprimée en pourcentage de la concentration initiale en ropivacaïne à J0.

La concentration moyenne de clonidine sur les 4 pompes natives dans les mêmes conditions reste à 98,99 % ($\pm 0,41\%$) de la concentration initiale. (Figure 4)

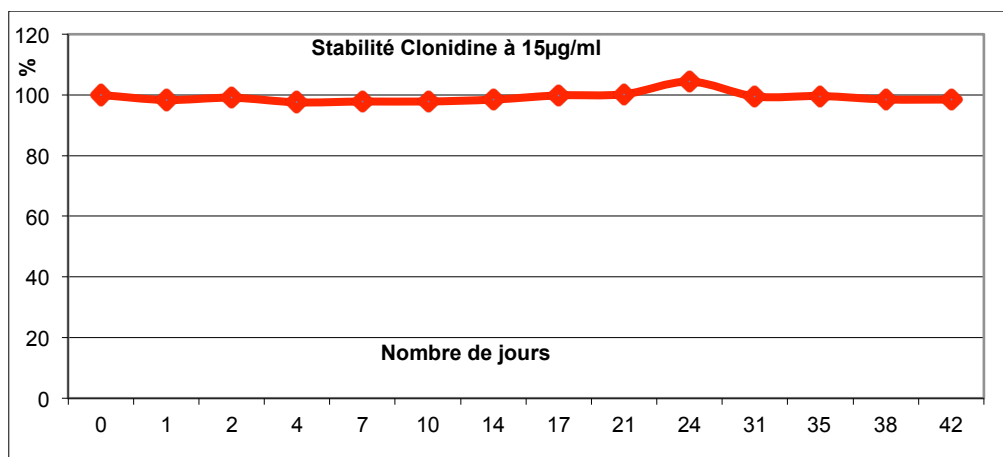


Figure 4. Stabilité de la clonidine à 15 µg/ml en mélange avec du ziconotide, de la morphine et de la ropivacaïne dans des pompes intrathécales naïves à 37°C in vitro. Concentration de clonidine exprimée en pourcentage de la concentration initiale à J0.

B. Stabilité ziconotide seul

Lors des dosages des solutions de ziconotide seul, uniquement trois dilutions différentes, ont pu être dosées (0,25µg/ml, 0,5µg/ml, 1µg/ml). En effet, le dosage de la solution de ziconotide 0,75 µg/ml n'a pu être réalisé, la pompe s'étant spontanément vidée dans l'étuve à la suite d'une mauvaise manipulation du programmeur.

L'analyse des échantillons prélevés sur les pompes non naïves contenant uniquement une solution de ziconotide avec sérum physiologique à des temps variables et à des concentrations variables met en évidence une décroissance par rapport à la concentration initiale.

La concentration de ziconotide diminue de façon quasi linéaire pour toutes les concentrations avec dès le 3^{ème} jour : 79,4 % ($\pm 0,02\%$) de la concentration initiale pour 0,25 µg/ml, 81,34% ($\pm 0,02\%$) pour 0,5 µg/ml et 82,36% ($\pm 0,02\%$) pour 1 µg/ml. A dix jours, on retrouve une concentration résiduelle en moyenne de 60,35% ($\pm 0,04\%$) de la concentration initiale à 0,25µg/ml, 51,49% ($\pm 0,02\%$) pour une concentration de 0,5 µg/ml, et 68,49% ($\pm 0,04\%$) pour 1 µg/ml.

Au trente et unième jour, la concentration résiduelle de ziconotide par rapport à la concentration initiale est de 35,54% ($\pm 0,04\%$) pour la concentration à 0,25µg/ml ,

de 39, 37% (+/- 0,15%) pour la concentration à 0,5µg/ml et de 44,49% (+/-0,18%) de la concentration initiale pour la concentration à 1µg/ml (Figure 5).

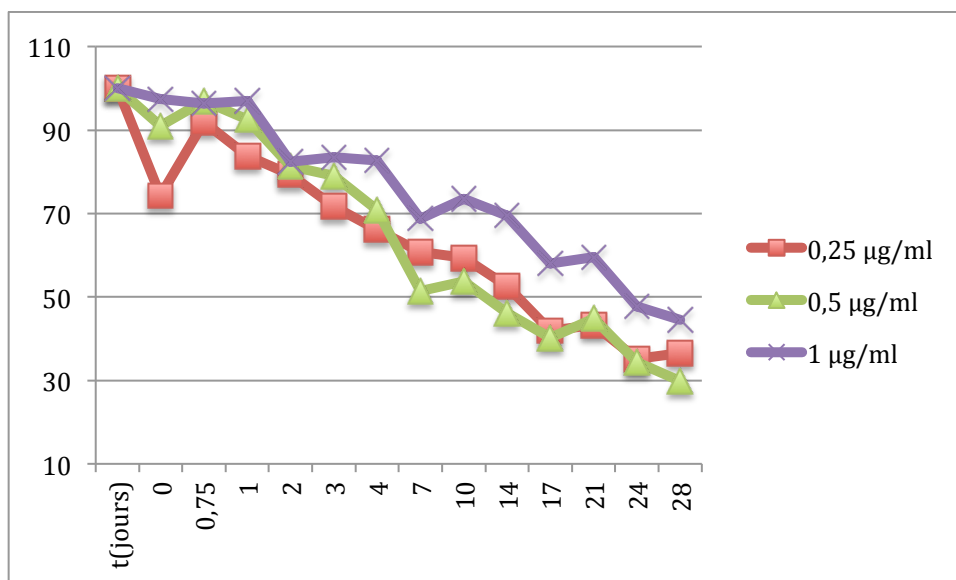


Figure 5. Stabilité du ziconotide seul dans des pompes Medtronic non naïves sous incubateurs à 37°C pour des concentrations de 0,25; 0,5 et 1 µg/ml. Les résultats sont exprimés en pourcentage de ziconotide dosé par rapport à la concentration initiale à J0.

C. Stabilité du ziconotide à 5°C dans les seringues

L'analyse des seringues initiales maintenues à 5°C montre une stabilité du ziconotide en mélange quelque soit le dosage initial. (Figure 6)

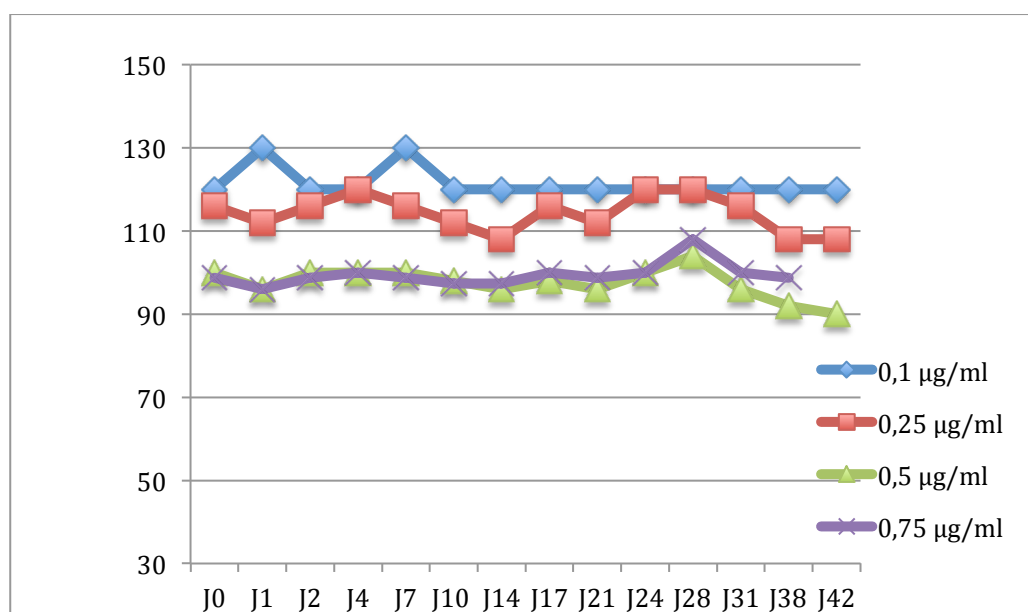


Figure 6. Stabilité du ziconotide (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 µg/ml) dans des mélanges à posologie stable de morphine (7,5mg/ml); clonidine (15 µg/ml); ropivacaïne (7,5 mg/ml) dans des seringues à 5°C. Les résultats sont exprimés en pourcentage de ziconotide dosé par rapport à la concentration initiale à J0.

D. Conformité des préparations de ziconotide.

La concentration initiale du ziconotide dans les seringues sur l'ensemble des prélèvements à J0 correspond aux concentrations prescrites avec une précision entre + 20% à -2,6%, moindre pour la plus faible concentration (concentration prescrite 0,1 µg/ml et concentration mesurée 0,12 µg/ml). Ces résultats permettent de conclure à un pourcentage d'erreur < 10 % en moyenne pour des concentrations supérieures ou égales à 0,25 µg/ml lors de la préparation du ziconotide, avec un écart type de 0,02 (Figure 7).

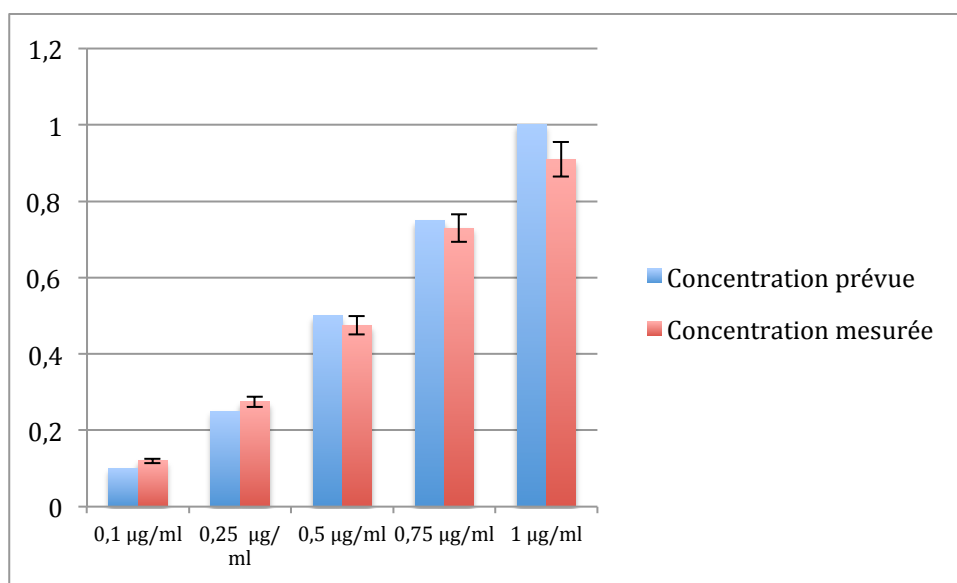


Figure 7. Conformité des préparations du ziconotide en mélange et seul aux posologies de 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 µg/ml et seul aux posologies de 0,25; 0,5 et 1 µg/ml.

IV. Discussion

A. Interprétation des résultats

Trois mécanismes de dégradation du ziconotide sont connus.

Le principal est l'oxydation. La dégradation a lieu quand l'oxygène dissous réagit avec l'acide aminé méthionine du peptide. La L-Méthionine libre (50µg/ml) incluse comme un excipient de la formulation du ziconotide est conçue pour réduire la dégradation du ziconotide, elle est plus aisément oxydée que celle de la w-conotoxin. Ce mécanisme de protection est évidemment atténué lors de la dilution du ziconotide avec une dilution concomitante de la L-méthionine qui entraîne une dégradation plus rapide par l'oxygène dissous [22]. Le second mécanisme est la dégradation par la chaleur, par dégradation de l'acide aspartique. Le troisième mécanisme de dégradation du ziconotide est la déamination de la cystéine par les oxydes de titane produits à la surface du réservoir de la pompe lors de la fabrication. Les produits de dégradation ne sont pas toxiques (données en ligne, Elan Pharmaceuticals Inc). Ce mécanisme absorbe environ 17µg de Ziconotide sur les pompes Synchromed II de 20ml et 28 à 30µg sur les pompes de 40ml [32].

En dehors de ces mécanismes, et malgré une vidange complète de la pompe, il persiste un espace mort de 1 à 2 ml qui accentue la dilution du ziconotide dans la pompe.

1. Stabilité du ziconotide en association

Peu d'études ont évalué la stabilité du ziconotide en condition d'utilisation clinique. Seuls Shields et al ont effectué ces travaux à des concentrations très différentes de celles de notre pratique clinique.

Notre étude met en évidence une diminution quasi linéaire de la concentration de ziconotide in vitro dans un mélange de morphine, ropivacaïne, clonidine et ziconotide. On retrouve en moyenne une concentration résiduelle de 82,72% à 7 jours, 72,85 % à 17 jours et 53,4% à 35 jours de la concentration initiale de ziconotide en mélange. Les autres produits restent quant à eux stables aux concentrations étudiées comme dans les études précédentes [22-25].

Lorsque l'on compare ces résultats avec ceux de Shields [23, 24], la posologie de morphine était plus faible dans notre étude (7,5 mg/ml) que dans celle de Shields (35 mg/ml) mais correspond plus aux conditions cliniques. La vitesse de dégradation semble légèrement plus importante dans notre étude avec des concentrations beaucoup plus faibles, mais Shields et al ont limité leur analyse à 17 et 20 jours (Figure 8) et si l'on exécute une régression linéaire, celle-ci montre une pente de décroissance très comparable et une projection de la concentration à 30 jours quasi identique, à 60 % de la concentration initiale (Figure 9).

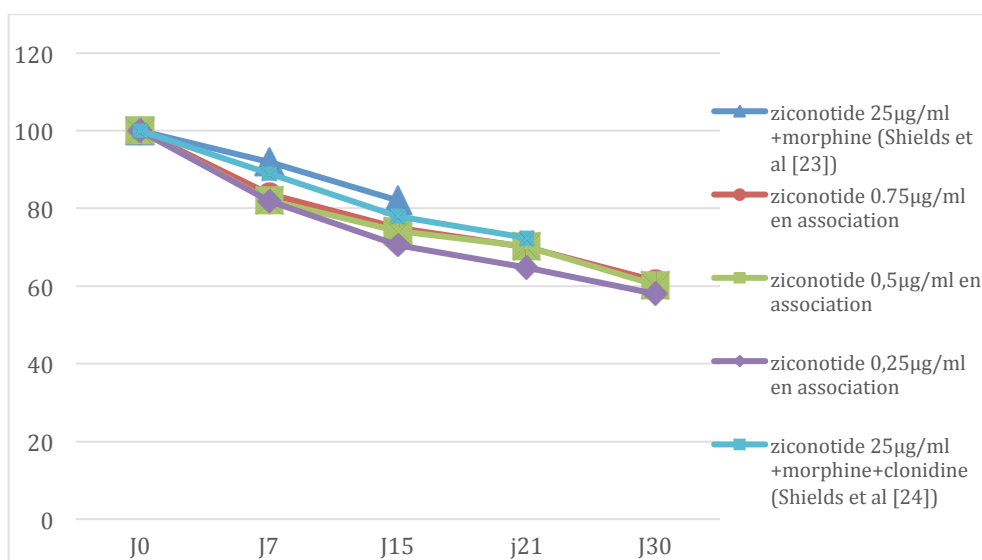


Figure 8. Evolution comparative des concentrations de ziconotide en association dans des pompes intrathécales in vitro. Comparaison des résultats de l'étude aux données de la littérature Shields et al [23], [24].

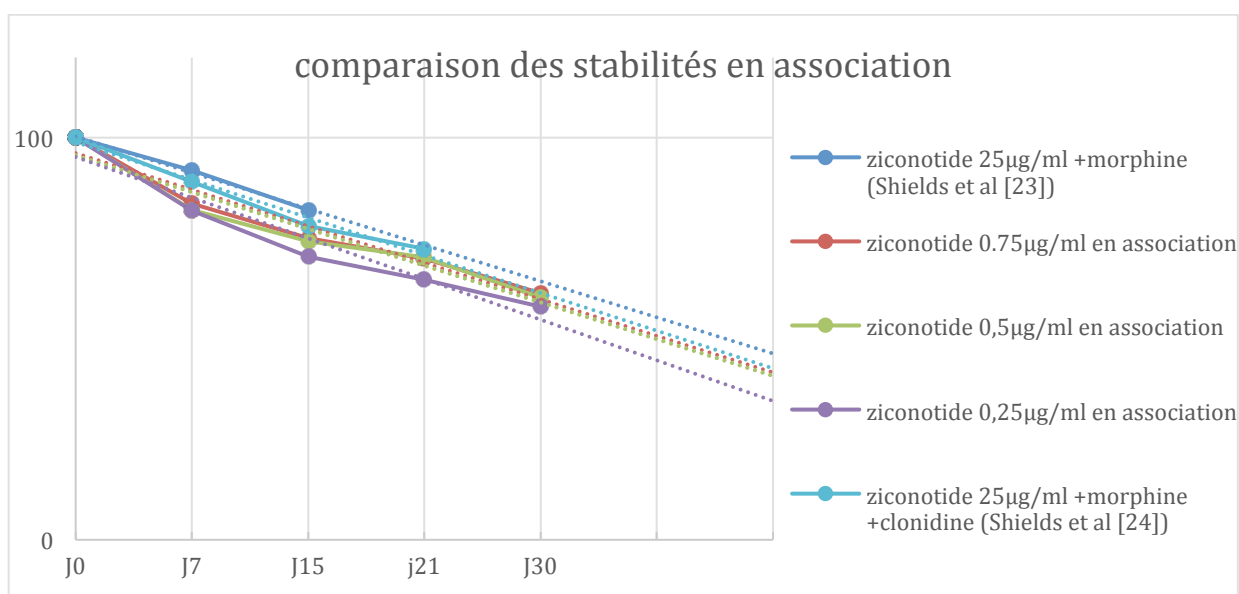


Figure 9. Evolution comparative des concentrations de ziconotide en association de l'étude aux données de la littérature Shields et al [23], et régression linéaire.

Aux faibles concentrations étudiées, la dégradation du ziconotide en association est presque linéaire et paraît n'être que faiblement influencée par la concentration initiale. Ces constatations, effectuées sur des pompes naïves, semblent montrer que la dégradation par déamination de la cystéine par l'oxyde de titane influence peu la dégradation du ziconotide.

2. Stabilité du ziconotide seul.

Dans l'étude de Shields et al [22], l'auteur retrouve une stabilité de 95% à J28 pour une solution de ziconotide seul à 100 $\mu\text{g/ml}$ sur des pompes naïves à 37°C. Il constate également une stabilité moins importante du ziconotide (25 $\mu\text{g/ml}$) lorsque celui-ci est dilué à partir de la formulation 100 $\mu\text{g/ml}$, 85,1% à J28 sur des pompes non naïves.

Notre étude concernait des dilutions beaucoup plus importantes de ziconotide seul 0,25; 0,5 et 1 $\mu\text{g/ml}$ dans des pompes non naïves. Nous constatons une décroissance plus importante des concentrations de ziconotide seul. Le ziconotide semble donc effectivement moins stable lorsqu'il est dilué. (Figure10)

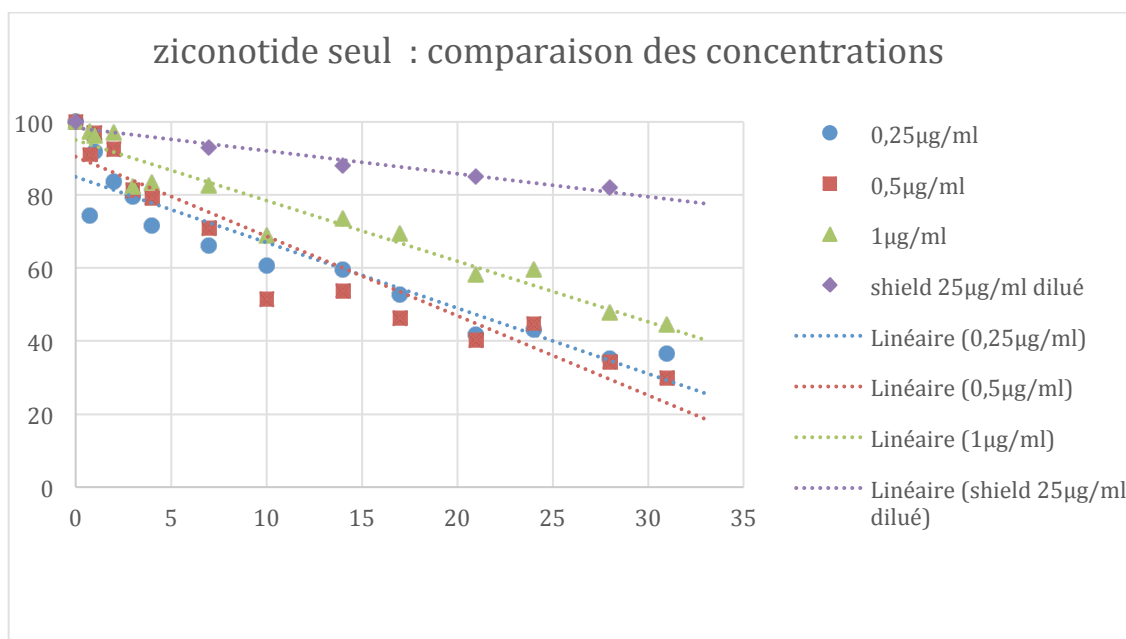


Figure 10. Comparaison des concentrations de ziconotide seul de l'étude aux données de la littérature Shields et al [22].

Cette dégradation plus importante du ziconotide lorsqu'il est très dilué peut s'expliquer par les trois mécanismes connus de dégradation du ziconotide et également par l'effet espace mort. Sur des pompes non naïves, le mécanisme principal est probablement la sensibilité plus élevée à l'oxygène. Shields et al ont comparé deux concentrations à 25µg/ml de ziconotide soit dilué, soit préparée avec une formulation commerciale de 25µg/ml disponible aux USA, la concentration réalisée à partir d'une formulation à 25µg/ml se dégrade moins vite qu'une solution à la même concentration préparée avec une formulation à 100µg/ml [22-24]. Dans notre étude, les produits utilisés étaient tous dilués, même si des précautions étaient prises lors de la préparation pour limiter l'oxygène dissous. Donc lors des préparations, il est indispensable de réduire les contacts avec l'air ambiant afin de limiter la dégradation du ziconotide par l'oxygène dissous.

3. Comparaison des cinétiques du ziconotide seul et en association à 0,25 et 0.5 µg/ml dans les pompes à 37°C.

Deux concentrations de ziconotide ont pu être comparées seul dans les pompes et en association; 0,25µg/ml et 0,5µg/ml. On retrouve une différence significative ($p < 0,05$) pour les deux dosages 0,25 et 0,5 µg/ml entre le ziconotide seul et en mélange similaire, dans des pompes à 37°C. La dégradation est significativement plus importante pour le ziconotide seul comparée au ziconotide en mélange morphine 7,5mg/ml, ropivacaïne 7,5mg /ml et clonidine 15 µg/ml pour des concentrations similaires de ziconotide de 0,25 et 0,5 µg/ml respectivement. (Figure 11 et 12)

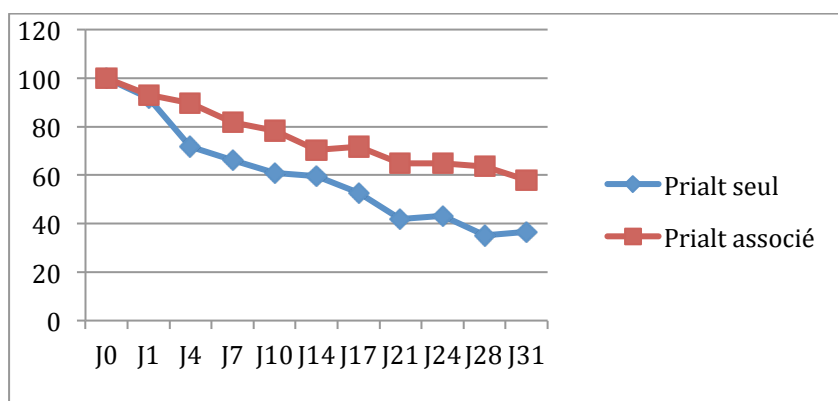


Figure 11. Comparaison ziconotide à la concentration de 0.25µg/ml seul et en mélange (morphine 7,5mg /ml, ropivacaïne 7,5mg /ml et clonidine 15 µg/ml) dans des pompes à 37°C.

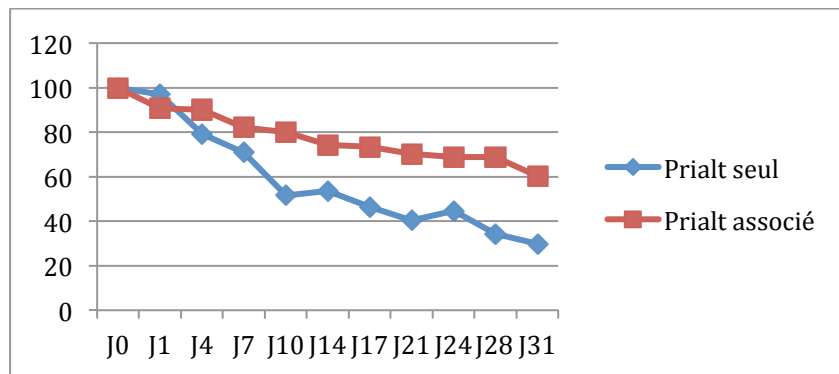


Figure. 12. Comparaison ziconotide à la concentration de 0.5µg/ml seul et en mélange (morphine 7,5mg /ml, ropivacaïne 7,5mg /ml /ml et clonidine 15 µg/ml) dans des pompes à 37°C.

Ces données vont à l'encontre des études précédentes [23-25] qui observaient une stabilité moindre du ziconotide lorsqu'il était associé à d'autres analgésiques. De plus, ces dosages de stabilité du ziconotide en mélange ont été réalisés sur des échantillons issus de pompes naïves alors que les dosages de ziconotide seul étaient réalisés à partir d'échantillons de pompes non naïves. Or le ziconotide apparaît plus stable dans des pompes non naïves [22].

Ces constatations contradictoires ne sont pas explicables en l'état. Il paraît prématuré de conclure à un effet protecteur des associations médicamenteuses sur la stabilité du ziconotide dans les pompes. En effet, l'échantillon dans notre étude est faible et il est indispensable de contrôler ses résultats sur un échantillon plus large.

4. Stabilité à 5 °C.

La température joue un rôle dans la dégradation du ziconotide. Dans notre étude, on ne retrouvait pas de dégradation du ziconotide en mélange à 5°C dans les seringues contrairement aux pompes à 37°C. Nous n'avons pas étudié la stabilité du ziconotide en mélange dans les seringues à 37 °C. Dans les études de Shields et al [23, 24], la dégradation du ziconotide en mélange à 37°C était similaire en seringue ou dans les pompes. Cette stabilité à 5 °C est particulièrement intéressante pour la conservation des préparations pharmaceutiques et pour le transport des mélanges au patient.

B. Intérêt clinique

1. Fréquence des remplissages

On constate dans notre étude qu'à partir de J10, les concentrations résiduelles de ziconotide en mélange sont égales ou inférieures à 80% des concentrations initiales. Cette diminution de concentration du ziconotide doit être prise en compte par les cliniciens, car elle pourrait expliquer une éventuelle baisse d'efficacité de l'analgésie chez les patients dont les remplissages sont plus espacés. Cependant dans notre pratique clinique, les intervalles de remplissage sont généralement inférieurs à 10 jours compte tenu de la concentration faible de l'anesthésique local (10mg/ml) [21]. De plus, lors de la phase de titration, il est nécessaire d'anticiper ce phénomène pour l'incrémentation des doses afin de prévenir les effets secondaires.

2. La conformité des préparations.

L'étude des concentrations des médicaments dans les préparations initiales a permis de mettre en évidence que celles-ci, telles qu'elles sont réalisées par la PUI de l'ICO, correspondaient aux dosages prescrits avec une précision de +/- 10 % et un écart type de 0,02 pour les concentrations supérieures ou égales à 0,25µg/ml. Par contre, pour les concentrations plus faibles, les variations sont plus importantes et elles ne peuvent être recommandées. Cette étude est une étude préalable et nécessitera d'être validée par un suivi prospectif des concentrations des préparations.

3. Conservation des préparations

D'autre part, la stabilité du ziconotide en mélange dans les seringues de préparation pharmaceutique à 5 °C permet de valider la conservation et éventuellement le transport des seringues de mélanges antalgiques intrathécaux à 5°C sans risque de dégradation. Cette stabilité est essentielle, en cancérologie, dans la mesure où les patients sont parfois difficilement transportables pour les remplissages en fin de vie. De plus certains hôpitaux ne disposent pas des structures nécessaires pour mettre en œuvre des préparations intrathécales conformes. Une des solutions à ce problème, est la préparation des mélanges par une pharmacie disposant des capacités de préparation sous conditions stériles et de contrôle de conformité, puis le transport des préparations afin d'assurer le remplissage de la pompe dans un hôpital de proximité, voir même à domicile.

C. Limites de l'étude

1. Données partielles

Les données recueillies lors de notre étude sont des données *in vitro* et nécessiteront d'être validées par une étude *in vivo* avec des concentrations de ziconotide différentes et des durées entre les remplissages variables, afin de mieux connaître l'évolution des concentrations de ziconotide en fonction de la concentration des autres composants et de la durée de l'exposition de la pompe au ziconotide. D'autre part, la stabilité moindre du ziconotide seul comparée à celle du ziconotide en mélange nécessite d'être validée sur des pompes naïves avec plusieurs dosages équivalents de ziconotide.

2. Absence de contrôle des seringues à 37°.

Lors de notre étude nous n'avons pas réalisé l'étude de la stabilité du ziconotide en mélange dans les seringues à 37°C. Cette étude aurait permis d'affirmer ou d'infirmer le rôle de la température dans la dégradation du ziconotide. En effet, nous pouvons juste affirmer que le ziconotide reste stable dans les seringues à 5°C. D'autre part, un autre mécanisme de dégradation décrit est la déamination de la cystéine provoquée par l'oxyde de titane produit à la surface interne des pompes réservoir. Ces données auraient permis d'établir le rôle intrinsèque des pompes dans la dégradation du ziconotide.

3. Analyse du pH.

Les solutions de ziconotide sont très sensibles aux variations de pH et nécessitent un pH autour de 5 [32]. Nous n'avons pas réalisé les dosages du pH des échantillons dosés. Nous ne pouvons donc exclure ce mode de dégradation des préparations que nous avons analysées. De plus une alerte récente de Medtronic met en garde les praticiens sur le risque de dommage des pompes avec des mélanges d'antalgiques de pH<3 [33].

V. Conclusion

Toutes ces données permettent de conclure que le ziconotide se dégrade seul et en mélange. Nos résultats sur la stabilité in vitro du ziconotide en mélange corroborent ceux de la littérature actuelle. Mais nous avons mis en évidence une stabilité moins importante du ziconotide seul plutôt qu'en mélange. Il sera nécessaire de réaliser une étude in vitro afin de confirmer ces données.

Le ziconotide a un faible index thérapeutique avec une stabilité d'autant plus faible que sa dilution est importante ce qui correspond à la pratique clinique. Par contre, l'association avec d'autres analgésiques au sein des pompes intrathécales ne semble pas diminuer significativement sa stabilité par rapport aux concentrations déjà évaluées. La stabilité du ziconotide apparaît même moins importante que lorsqu'il est seul en solution. Le ziconotide en association est stable à 5°C dans des seringues ce qui permet sa conservation et son transport dans ces conditions de température.

La diminution des concentrations de ziconotide au cours du temps implique de prendre en compte ces données pour évaluer l'efficacité clinique du ziconotide et des remplissages fréquents.

Les dosages des concentrations de médicaments dans les mélanges intrathécaux sont à ce jour uniquement réalisés dans le cadre d'études, en raison de la complexité du processus et du coût du matériel. Grâce aux progrès techniques, il est possible d'effectuer aujourd'hui ces dosages en quelques minutes de façon prospective. Ainsi, on pourra mieux connaître, l'ensemble des données manquantes à ce jour. La stabilité du produit à 5°C permettra d'envisager une production de ces mélanges par des pharmacies spécialisées avec un contrôle systématique de la qualité des productions.

Bibliographie

1. Smith, T.J., et al., *Randomized clinical trial of an implantable drug delivery system compared with comprehensive medical management for refractory cancer pain: impact on pain, drug-related toxicity, and survival*. J Clin Oncol, 2002. **20**(19): p. 4040-9.
2. Deer, T., et al., *Polyanalgesic consensus conference 2007: recommendations for the management of pain by intrathecal (intraspinal) drug delivery: report of an interdisciplinary expert panel*. Neuromodulation, 2007. **10**(4): p. 300-28.
3. Deer, T.R., *Polyanalgesic consensus conference 2012*. Neuromodulation, 2012. **15**(5): p. 418-9.
4. Deer, T.R., et al., *Polyanalgesic Consensus Conference-2012: Recommendations to Reduce Morbidity and Mortality in Intrathecal Drug Delivery in the Treatment of Chronic Pain*. Neuromodulation, 2012. **15**(5): p. 467-482.
5. Deer, T.R., et al., *Polyanalgesic Consensus Conference-2012: Consensus on Diagnosis, Detection, and Treatment of Catheter-Tip Granulomas (Inflammatory Masses)*. Neuromodulation, 2012. **15**(5): p. 483-496.
6. Deer, T.R., et al., *Comprehensive consensus based guidelines on intrathecal drug delivery systems in the treatment of pain caused by cancer pain*. Pain Physician, 2011. **14**(3): p. E283-312.
7. Williams, J.A., M. Day, and J.E. Heavner, *Ziconotide: an update and review*. Expert Opin Pharmacother, 2008. **9**(9): p. 1575-83.
8. Wallace, M.S., *Ziconotide: a new nonopioid intrathecal analgesic for the treatment of chronic pain*. Expert Rev Neurother, 2006. **6**(10): p. 1423-8.
9. Schmidtke, A., et al., *Ziconotide for treatment of severe chronic pain*. Lancet, 2010. **375**(9725): p. 1569-77.
10. Chaplan, S.R., J.W. Pogrel, and T.L. Yaksh, *Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **269**(3): p. 1117-23.
11. Malmberg, A.B. and T.L. Yaksh, *Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception*. J Neurosci, 1994. **14**(8): p. 4882-90.
12. Staats, P.S., et al., *Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial*. JAMA, 2004. **291**(1): p. 63-70.
13. Rauck, R.L., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled study of intrathecal ziconotide in adults with severe chronic pain*. J Pain Symptom Manage, 2006. **31**(5): p. 393-406.
14. administration, F.a.d., *ziconotide intrathecal infusion approval letter*. 2004.
15. Agency, E.m., *Ziconotide approval*. emea european 2005.
16. Alicino, I., et al., *Intrathecal combination of ziconotide and morphine for refractory cancer pain: a rapidly acting and effective choice*. Pain, 2012. **153**(1): p. 245-9.
17. Wallace, M.S., R.L. Rauck, and T. Deer, *Ziconotide combination intrathecal therapy: rationale and evidence*. Clin J Pain, 2010. **26**(7): p. 635-44.
18. Hassenbusch, S.J., et al., *Polyanalgesic Consensus Conference 2003: an update on the management of pain by intraspinal drug delivery-- report of an expert panel*. J Pain Symptom Manage, 2004. **27**(6): p. 540-63.

19. Portenoy, R.K. and S.J. Hassenbusch, *PolyAnalgesic consensus conference 2000*. J Pain Symptom Manage, 2000. **20**(2): p. S3.
20. Dupoirion D, L.-k.D., Brenet O, de Bourmont S, Grelon F, Dixmeria F, Buisset N, Monnin D, *Douleur chronique cancéreuse et analgésie intrathécale : expérience de trois centres de lutte contre le cancer*. Douleurs, 2011. **12**(3): p. 140-146.
21. Dupoirion, D., et al., *Ziconotide adverse events in patients with cancer pain: a multicenter observational study of a slow titration, multidrug protocol*. Pain Physician, 2012. **15**(5): p. 395-403.
22. Shields, D.E., et al., *Statistical evaluation of the chemical stability of ziconotide solutions during simulated intrathecal administration*. J Pain Symptom Manage, 2008. **36**(1): p. e4-6.
23. Shields, D., R. Montenegro, and M. Ragusa, *Chemical Stability of Admixtures Combining Ziconotide with Morphine or Hydromorphone During Simulated Intrathecal Administration*. Neuromodulation, 2005. **8**(4): p. 257-63.
24. Shields, D. and R. Montenegro, *Chemical stability of ziconotide-clonidine hydrochloride admixtures with and without morphine sulfate during simulated intrathecal administration*. Neuromodulation, 2007. **10 Suppl 1**: p. 6-11.
25. Shields, D., R. Montenegro, and J. Aclan, *Chemical stability of an admixture combining ziconotide and bupivacaine during simulated intrathecal administration*. Neuromodulation, 2007. **10 Suppl 1**: p. 1-5.
26. Raffaelli, W., et al., *Italian registry on long-term intrathecal ziconotide treatment*. Pain Physician, 2011. **14**(1): p. 15-24.
27. Bernards, C.M., et al., *Epidural, cerebrospinal fluid, and plasma pharmacokinetics of epidural opioids (part 2): effect of epinephrine*. Anesthesiology, 2003. **99**(2): p. 466-75.
28. Miele, V.J., et al., *A review of intrathecal morphine therapy related granulomas*. Eur J Pain, 2006. **10**(3): p. 251-61.
29. Ackerman, L.L., K.A. Follett, and R.W. Rosenquist, *Long-term outcomes during treatment of chronic pain with intrathecal clonidine or clonidine/opioid combinations*. J Pain Symptom Manage, 2003. **26**(1): p. 668-77.
30. Hassenbusch, S.J., et al., *Intrathecal clonidine in the treatment of intractable pain: a phase I/II study*. Pain Med, 2002. **3**(2): p. 85-91.
31. Deer, T.R., et al., *Clinical experience with intrathecal bupivacaine in combination with opioid for the treatment of chronic pain related to failed back surgery syndrome and metastatic cancer pain of the spine*. Spine J, 2002. **2**(4): p. 274-8.
32. Webster L. R, F.K.L., *ziconotide for chronic severe pain*. Practical PAIN MANAGEMENT,, 2005.
33. medtronic, *Increased Risk of Motor Stall and Loss of or Change in Therapy with Unapproved Drug Formulations*.
http://professional.medtronic.com/wcm/groups/mdtcom_sg/@mdt/@neuro/documents/documents/risk-motor-stall.pdf 2012.

Liste des figures

Figure 1.

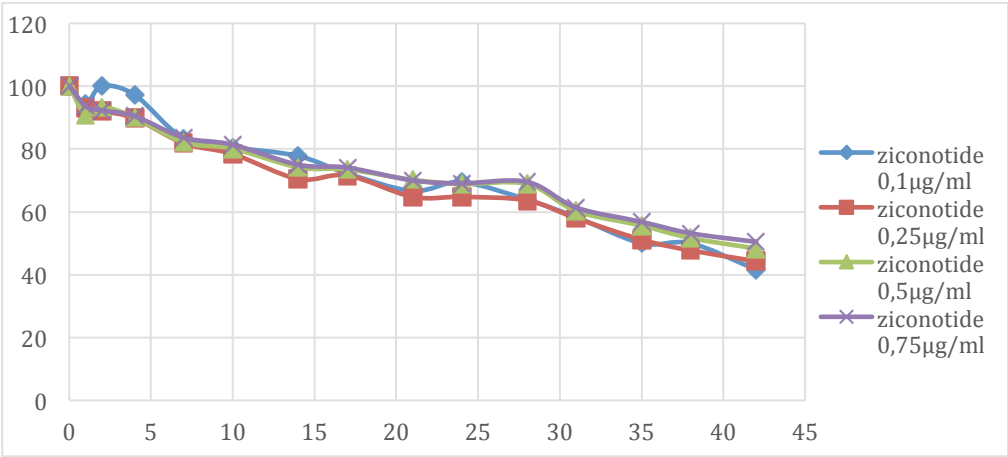


Figure 1. Stabilité du ziconotide (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 µg/ml) en mélange avec des dosages fixes de morphine (7,5mg/ml), clonidine (15mcg/ml), ropivacaïne (7,5 mg/ml) in vitro, pompes naïves à 37°C. Concentration de ziconotide exprimée en pourcentage de la concentration initiale de ziconotide à J0. Données exprimées en pourcentage de la concentration initiale.

Figure 2.

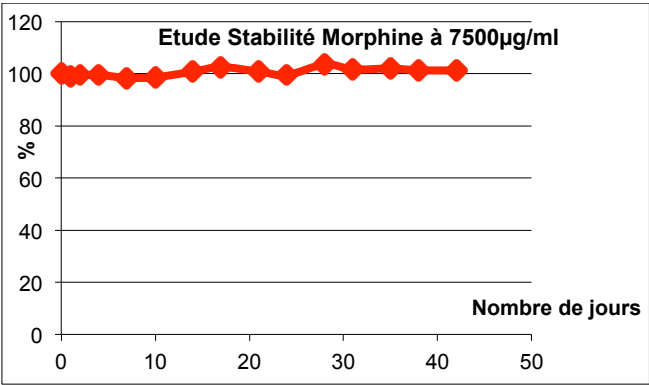


Figure 2. Stabilité de la morphine 7500 µg/ml en mélange avec ziconotide, ropivacaïne et clonidine dans des pompes intrathécales naïves à 37°C in vitro. Concentration de morphine exprimée en pourcentage de la concentration initiale en morphine à J0.

Figure 3.

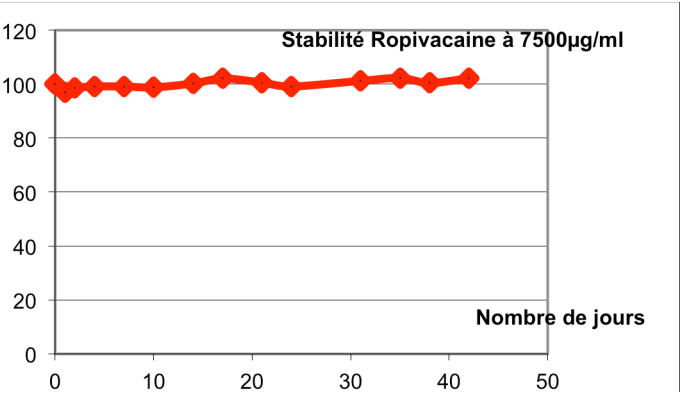


Figure 3. Stabilité de la ropivacaïne 7500 µg/ml en mélange avec ziconotide, morphine et clonidine dans des pompes intrathécales naïves à 37°C in vitro. Concentration de morphine exprimée en pourcentage de la concentration initiale en ropivacaïne à J0.

Figure 4.

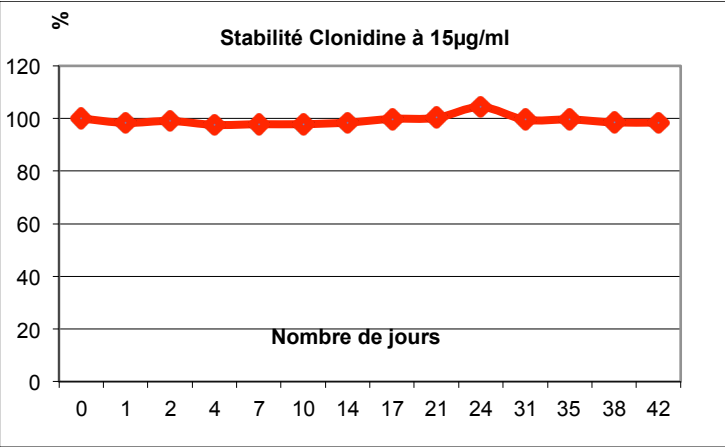


Figure 4. Stabilité de la clonidine à 15 µg/ml en mélange avec du ziconotide, de la morphine et de la ropivacaïne dans des pompes intrathécales naïves à 37°C in vitro. Concentration de clonidine exprimée en pourcentage de la concentration initiale à J0.

Figure 5.

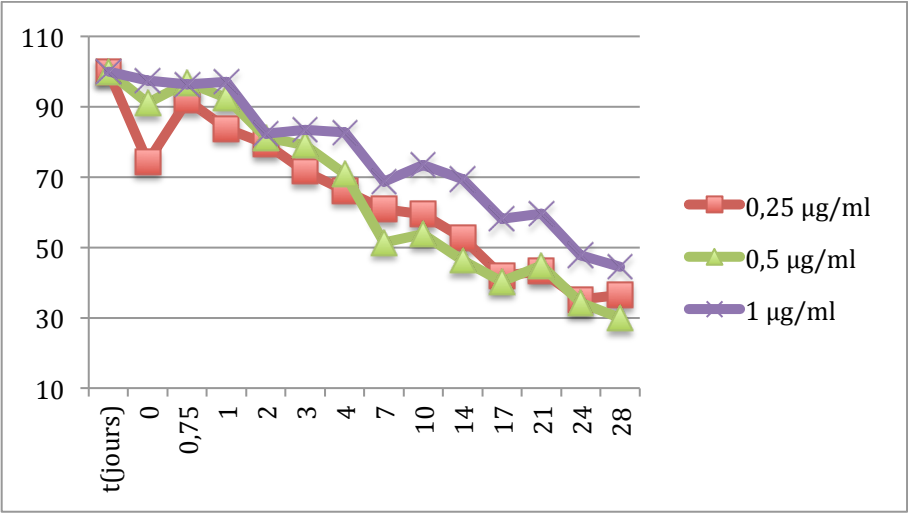


Figure 5. Stabilité du ziconotide seul dans des pompes Medtronic non naïves sous incubateurs à 37°C pour des concentrations de 0,25; 0,5 et 1 µg/ml. Les résultats sont exprimés en pourcentage de ziconotide dosé par rapport à la concentration initiale.

Figure 6.

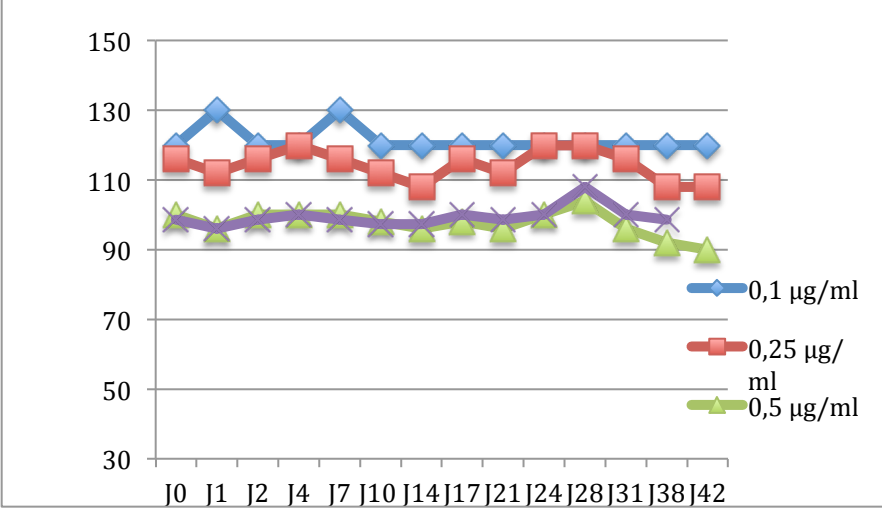


Figure 6 : Stabilité du ziconotide (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 µg/ml) dans des mélanges à posologie stable de morphine (7,5mg/ml); clonidine (15 µg/ml); r Les résultats sont exprimés en pourcentage de ziconotide dosé par rapport à la concentration initiale. opivacaïne (7,5 mg/ml) dans des seringues à 5°C.

Figure 7.

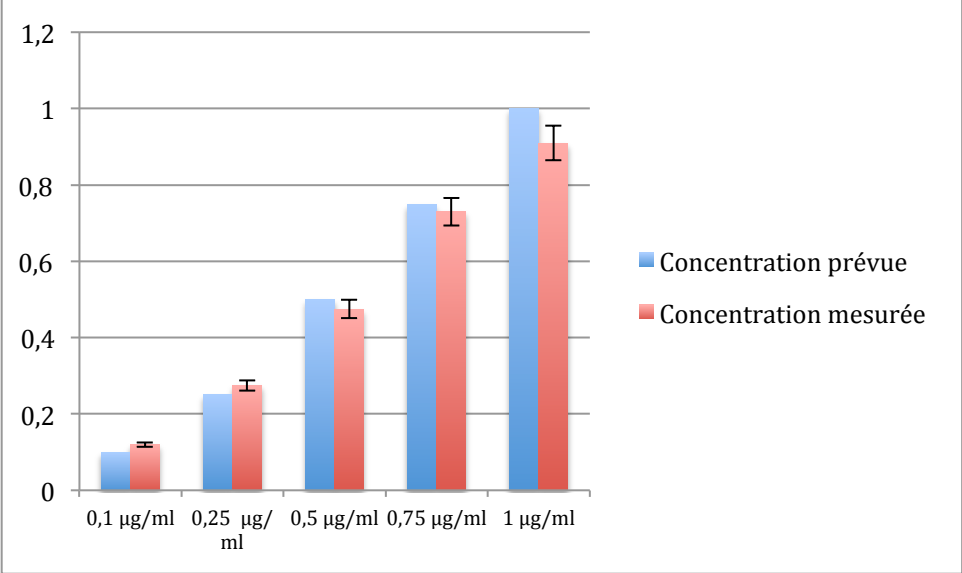


Figure 7. Conformité des préparations du ziconotide en mélange et seul aux posologies de 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 µg/ml et seul aux posologies de 0,25; 0,5 et 1 µg/ml.

Figure 8.

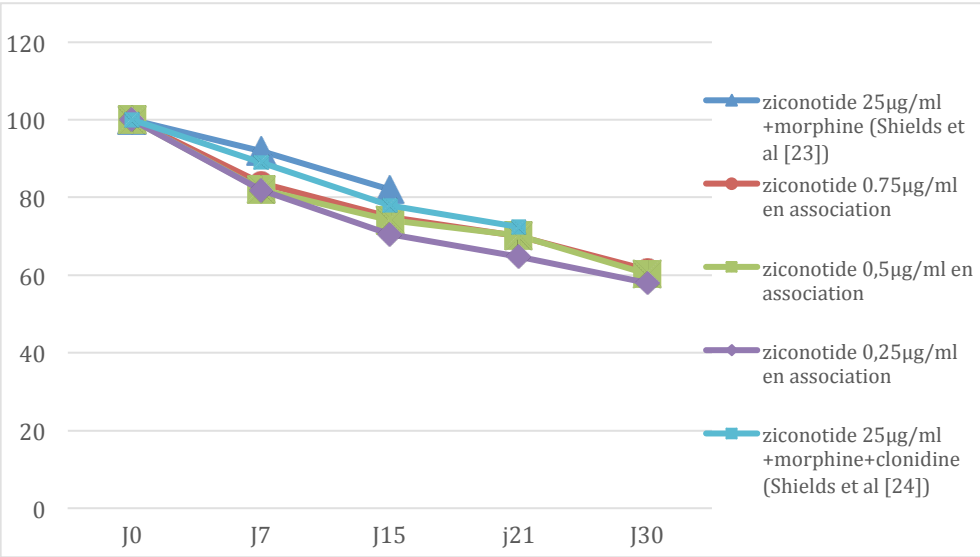


Figure 8. Evolution comparative des concentrations de ziconotide en association dans des pompes intrathécales in vitro. Comparaison des résultats de l'étude aux données de la littérature Shields et al [23], [24].

Figure 9.

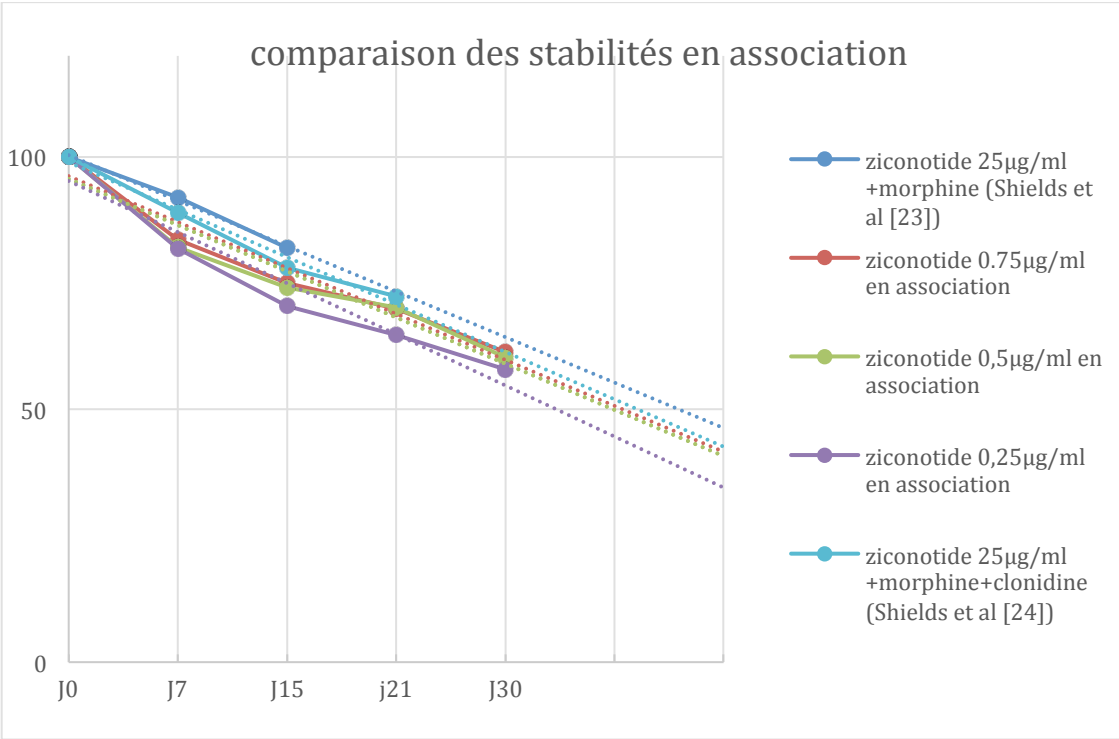


Figure 9. Evolution comparative des concentrations de ziconotide en association de l'étude aux données de la littérature Shields et al [23], et régression linéaire. Résultats exprimés en pourcentage de la concentration initiale.

Figure 10.

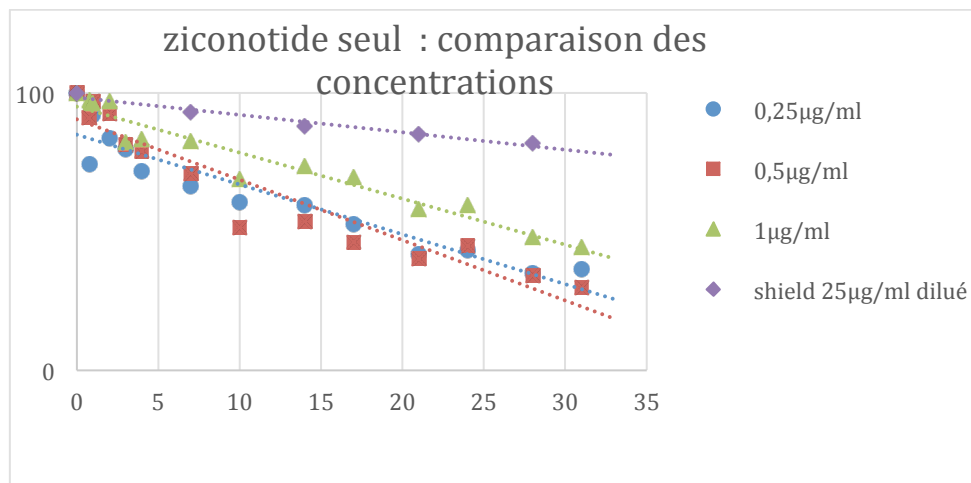


Figure 10. Comparaison des concentrations de ziconotide seul de l'étude aux données de la littérature Shields et al [22].

Figure 11.

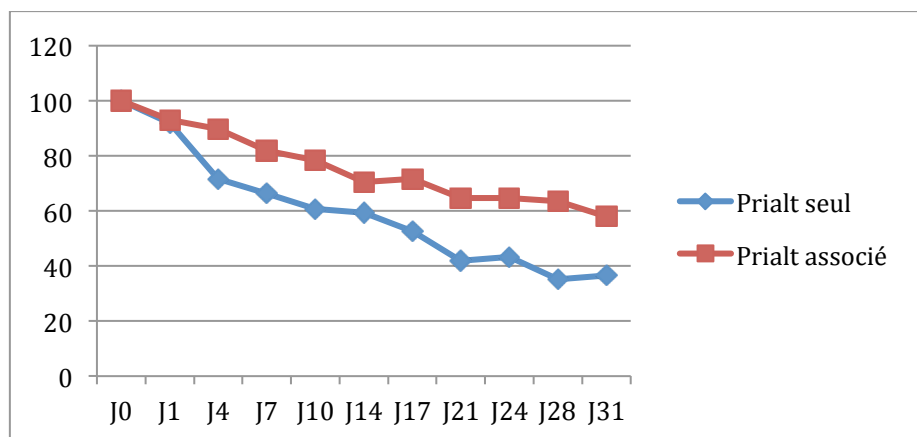


Figure 11. Comparaison ziconotide à la concentration de 0,25µg/ml seul et en mélange (morphine 7,5mg /ml, ropivacaine 7,5mg /ml et clonidine 15 µg/ml) dans des pompes à 37°C.

Figure 12.

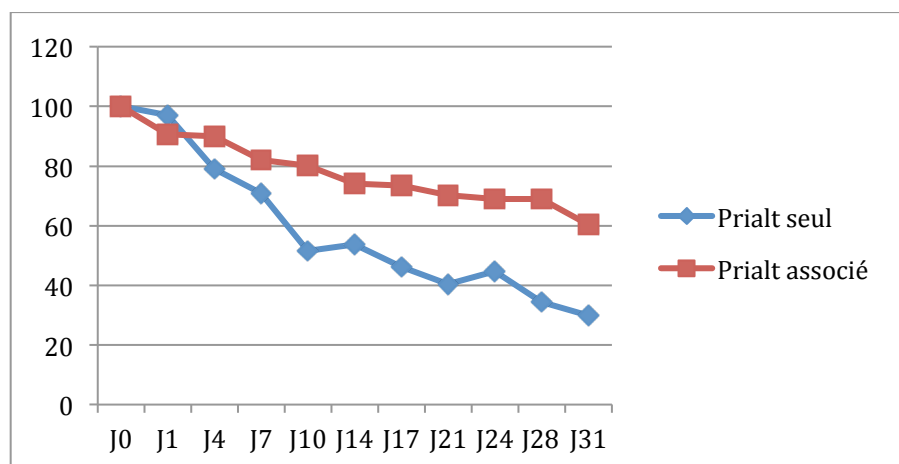
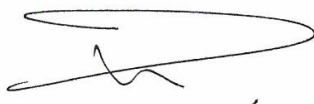


Figure. 12. Comparaison ziconotide à la concentration de 0,5µg/ml seul et en mélange (morphine 7,5mg /ml, ropivacaine 7,5mg /ml et clonidine 15 µg/ml) dans des pompes à 37°C.

PERMIS D'IMPRIMER

THÈSE DE Madame RICHARD MOUBARAK
Hélène

Vu, le Directeur de thèse



Vu, le Président du jury de thèse



**Vu, le Doyen de la
Faculté de Médecine
d'ANGERS**



Professeur I. RICHARD

Vu et permis d'imprimer

